

PCT/JP.99/06076

09288109947

EU

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 21 JAN 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月30日

JP99/6076

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第311408号

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団
新井 賢一
正井 久雄

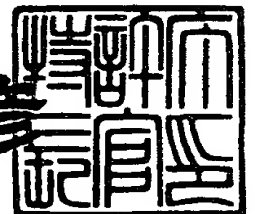
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3091440

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP98282-YS

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 13/00

【発明の名称】 ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードする
cDNA

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-6-206

 【氏名】 新井 賢一

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シヤ
ンボール三田620号

 【氏名】 正井 久雄

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-6-206

 【氏名又は名称】 新井 賢一

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シヤ
ンボール三田620号

 【氏名又は名称】 正井 久雄

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009911
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトH37タンパク質と、
このタンパク質をコードするcDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項4】 配列番号2のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項5】 請求項1また2のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子。

【請求項6】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3の塩基配列を有するcDNA、または配列番号3の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項7】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号4の塩基配列を有するcDNA、または配列番号4の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項8】 請求項6のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項9】 請求項7のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項10】 請求項6のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項11】 請求項7のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項12】 請求項1または2のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項13】 請求項3または4のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項14】 請求項6のcDNAまたは請求項8のDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法。

【請求項15】 請求項7のcDNAまたは請求項9のDNA断片を発現制

御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖制御方法。

【請求項 16】 請求項 10 の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

【請求項 17】 請求項 11 の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願は、ヒト H37 タンパク質と、このタンパク質をコードする cDNA に関するものである。さらに詳しくは、この出願は、ヒト細胞の複製を制御するタンパク質 Cdc7 の活性制御サブユニットであるヒト H37 タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびその cDNA、H37 タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

細胞の増殖は、増殖因子と呼ばれる液性因子が細胞表面の受容体に結合し、細胞内に増殖にシグナルが伝達されることによって開始される。従って、培養細胞の増殖を人為的に誘導するためには、細胞培地に増殖因子を過剰量添加したり、あるいはその細胞が本来は持っていない受容体を細胞表面に発現させ、その受容体に特異的な因子を培地に添加する方法等がとられてきた。また、細胞増殖を抑制するためには、受容体タンパク質に対する抗体や拮抗分子等を培地に添加し、受容体への増殖因子の結合を阻害する方法等が採用されてきた。

【0003】

一方、受容体への増殖因子の結合によって増殖シグナルが発せられた細胞は、そのゲノム DNA を複製し、娘細胞に均等に配分したのち分裂するというサイクルを繰り返す。このサイクルを、特に真核生物については「細胞周期」という。細胞周期は基本的に 4 期間に区分されている。すなわち、染色体 DNA が複製する S 期、複製した染色体が紡錘体によって分裂したのち細胞質が分裂する M 期、

M期が終わりS期が始まるまでのG1期、そしてS期が完了してM期が始まるまでのG2期である。特にG1期からS期への移行は厳密に制御されており、DNA複製はS期において1回だけ生じるようになっている。

【0004】

このような細胞周期は、酵母や高等真核細胞での研究からサイクリン依存性キナーゼがその進行に重要な役割を果たしていることが証明されている (Nature 292:558-560, 1981; Cell 66:731-742, 1991; Nature 349:338-393, 1991; Science 257:1958-1961, 1992; Bioessays 17:471, 1995)。また、酵母における遺伝学的解析からは、S期の開始時 (G1-S移行) には別のセリン/スレオニンキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。すなわち、細胞分裂周期変異株の一つとして単離されたcdc7変異 (J. Mol. Biol. 59:183-194, 1971) において、Cdc7タンパク質キナーゼは染色体DNAの複製の開始直前に機能すること、そしてS期を通じて各複製起点の活性化に必要とされていることが明らかになってきた (Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598, 1986; Genes Dev. 15:480-490, 1998; Genes Dev. 15:491-501, 1998)。また、Cdc7のキナーゼ活性は制御サブユニットであるDbf4の存在に依存することも明らかにされている (Genetics 131:21-29, 1992; Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993)。Dbf4の発現は周期的であって、転写レベルおよび翻訳後レベルの両方で制御されており (Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)、G1-S境界期におけるCdc7キナーゼ活性の増加の少なくとも一部はDbf4の発現がG1後期に増加することによって説明されている (Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993; Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)。さらに、Dbf4は細胞内で複製起点と相互に作用する (Science 265:1243-1246, 1994) ことから、Cdc7は複製起点上に形成される複製装置を直接的に活性化することによりS期開始の引き金になっていると考えられている。

【0005】

そしてさらに、この出願の発明者らは、これまでに酵母Cdc7に類似したキナーゼを分裂酵母、アフリカツメガエル、マウスおよびヒトから単離し、真核細胞の染色体複製は種差を超えて共通に保存されたこのキナーゼファミリーを含む機

構によって制御されていることを指摘している (J. Biol. Chem. 273:23248-23257, 1998; EMBO J. 16:4340-4351, 1997; EMBO J. 14:3094-3104, 1995)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

以上のとおりの酵母および高等真核生物における知見から、細胞内のCdc7キナーゼ活性をコントロールすることによって、増殖因子／受容体結合の操作による従来方法とは全く別の手続による細胞増殖の人為的制御が可能になるものと期待される。

【0007】

しかしながら、この出願の発明者らはまた、ヒトのCdc7ホモログの候補であるhuCdc7を動物細胞で増産させても、あるいは昆虫細胞で発現させてもそれ単独ではほとんどキナーゼ活性を示さないことを見出している。

そこで、ヒトCdc7の制御サブユニットの存在を想定し、ヒトcDNAライブラリーを探索した結果、huCdc7に結合してそのキナーゼ活性を制御する新規なタンパク質をコードするcDNAを単離することに成功し、このcDNAにコードされたタンパク質をH37タンパク質と命名した。

【0008】

この出願の発明は、発明者らによって取得されたこの新規タンパク質H37を産業上利用可能な形態として提供することを課題としている。

またこの出願は、このタンパク質をコードするヒト遺伝子、この遺伝子のcDNAおよびタンパク質に対する抗体等の遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

【0009】

さらにこの出願は、これらの遺伝子操作材料を用いてヒト細胞の増殖を人的に制御する方法を提供することを課題としてもいる。

【0010】

【課題を解決するための手段】

この出願は、上記の課題を解決する発明として、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質を提供する。

また、この出願は、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列における 1 もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒト H37 タンパク質を提供する。

【0011】

さらに、この出願は、上記のヒト H37 タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子の cDNA であって、配列番号 3 または 4 の塩基配列を有する cDNA、およびこれら cDNA のの一部配列からなる DNA 断片を提供する。

さらにまたこの出願は、上記 cDNA を保有する組換えベクター、およびヒト H37 タンパク質に対する抗体を提供する。

【0012】

そしてまたこの出願は、前記 cDNA またはその部分的あるいは一部を改変し変異を導入した DNA 断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法、ならびに前記抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法を提供する。

以下、この発明の実施の形態について詳しく説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

この発明のヒト H37 タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有し、配列番号 3 に塩基配列を示した cDNA の 518 から 2541 番目までの配列領域にコードされているタンパク質分子である。この発明の H37 タンパク質はまた、配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、配列番号 4 の cDNA における 518 から 1222 番目までの配列領域にコードされているタンパク質である。配列番号 3 および 4 は同一のゲノム遺伝子から転写された mRNA を鋳型とする cDNA であるが、配列番号 4 の cDNA は、配列番号 3 とは別のスプライシングフォームであり、配列番号 3 の 1199-1259 番目までが欠失している。

【0014】

これらの H37 タンパク質は公知の方法、すなわちヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいはこの発明によって提供される cDNA

断片を用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってH37タンパク質を取得する場合には、この発明のcDNA断片を有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、cDNAがコードするH37タンパク質を大量に発現させることができる。

【0015】

この発明のヒトH37タンパク質を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のcDNAの翻訳領域を挿入結合して組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、cDNAがコードしているH37タンパク質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、cDNAがコードするタンパク質部分のみを取得することもできる。

【0016】

この発明のヒトH37タンパク質を動物細胞で発現させる場合には、この発明のcDNAの翻訳領域を、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、この発明のH37タンパク質を動物細胞内で発現できる。

以上のとおりの方法によって得られるヒトH37タンパク質は、例えば、細胞内のhuCdc7のキナーゼ活性を阻害することによって細胞の増殖を抑制するための抗体作成のための抗原として使用することができる。

【0017】

また、この発明のヒトH37タンパク質は、後記する実施例において実証されているように、構造上はこれまでに明らかにされているサイクリンとはほとんど類似性を持たないが、その発現が細胞周期によって制御されること、またhuCdc

7 触媒サブユニットに結合してそのキナーゼ活性を活性化するという点で、huCdc7 キナーゼのサイクリン様構成因子とみなすことができる。従って、H37 タンパク質は増殖因子によって誘導される細胞増殖のためのシグナル伝達経路において非常に重要な標的因子と考えられることから、H37 タンパク質の発現あるいはその活性がG1-S期の細胞周期のシグナルによってどのように制御されているかを明らかにすることが、動物細胞における細胞複製の細胞周期制御の分子機構を明らかにする上で大きな新しい知見を提供するものと期待される。

【0018】

この発明のヒトH37 タンパク質には、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。

この発明の遺伝子は、上記ヒトH37 タンパク質をコードするヒトの遺伝子であって、例えば、この発明のcDNAまたはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリーから単離することができる。

【0019】

この発明のcDNAは、配列番号3または4で表される塩基配列を有することを特徴とするものであり、例えばヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローニングすることができる。cDNAはヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺ RNAを鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。cDNAは、岡山-Berg法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2:161-170, 1982)、Gubler-Hoffman 法 (Gubler, U. and Hoffman, J. Gene, 25:263-269, 1983)、キャッピング法 (Kato, S. et al., Gene, 150:243-250, 1994) などの公知の方法を用いて作製することができる。

【0020】

この発明のヒトH37 タンパク質は脳および腎臓以外のいかなる組織でも発現しているので、配列番号3または4に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNA

ライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明の cDNA と同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて、目的 cDNA を合成することもできる。

【0021】

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号 3 または 4 において、1 または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされている cDNA もこの発明に含まれる。

同様に、これらの変更によって生じる 1 または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換がなされているタンパク質も、配列番号 1 または 2 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を有する限り、この発明に含まれる。また、人為的に 1 または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換を導入した変異タンパク質もこの発明に含まれる。

【0022】

この発明の DNA 断片には、配列番号 3 または 4 で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含む cDNA 断片 (10bp 以上)、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなる DNA 断片も含まれる。

この発明のヒト H37 タンパク質に対する抗体は、タンパク質それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0023】

この発明の細胞増殖促進方法は、配列番号 3 または 4 の塩基配列を有する cDNA、もしくはそれらの一部配列からなる DNA 断片 (例えば後記実施例 3 に示したように、C 端側の 419 個のアミノ酸配列領域をコードする DNA 断片) とその発現制御配列 (動物細胞用プロモーターおよび／またはエンハンサー配列) からなる組換え DNA を動物細胞に導入し、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有する H37 タンパク質を細胞核内で過剰発現させることによって行うことができる。組換え DNA の細胞内への導入は公知の方法により行うことができる。例

例えばリン酸カルシウム法、リボソームや赤血球ゴーストを用いる方法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法、ガラスピペットによる微量注入法等である。このような細胞増殖の促進は、例えば、ヒト疾患の治療に有用な幹細胞を大量に取得するために有用である。すなわち、血液幹細胞や神経幹細胞など、他種類の細胞に分化する幹細胞は、ヒトの身体を構成する多くのタンパク質を作り出すことができるため、白血病等の疾患において幹細胞の移植は極めて重要な治療手段である。しかしながら、幹細胞を分化させることなしに自己増殖させる液性因子は同定されていないため、治療に必要な量の幹細胞を調製することは容易ではなかった。この発明の方法は、幹細胞内の増殖プログラムを操作することによって試験管内で無制限に細胞を自己複製、自己増殖させることを可能にする。また、このような試験内での細胞増殖促進は、*ex vivo* 方式による遺伝子治療のための遺伝子導入用細胞を大量に調製するためにも有用である。

【0024】

この発明の細胞増殖抑制方法は、前記の抗体を細胞内に注入することによって行うことができる。あるいは、細胞内在性のH37タンパク質遺伝子の発現を阻害することによっても行うことができる。例えば、遺伝子の転写産物に対するアンチセンス配列またはリボザイム配列をコードするDNAを細胞内に導入する方法等である。このような細胞増殖の抑制は、例えば癌細胞の過剰増殖を抑制するための新たな手段を提供するものと期待される。

【0025】

【実施例】

次に実施例を示しこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1：

HeLa細胞のcDNAライブラリーをpGAD-GHベクターを用いて作成し、huCdc7がGal4のDNA結合ドメインに融合された組換えプラスミドを保有する酵母CG1945株に各ベクターを導入した。約 3×10^5 個の形質転換体酵母をスクリーニングした結果、ベータガラクトシダーゼが陽性のクローンを5個

得た。インサートのDNA塩基配列を決定し、データベースを検索した結果、これらは全て新しいcDNAであった。そのうち3クローンは同一のものであり、配列番号1の塩基配列を有していた。このcDNAをH37と命名した。他の2つは単独のクローンであり、それぞれH1およびH18と命名した。

【0026】

これらの陽性クローンによるコードされるタンパク質とhuCdc7との相互作用を動物細胞における増産系を用いてさらに検討した。すなわち、myc エピトープで標識したH1、H18およびH37のそれぞれの発現プラスミドを全長huCdc7発現プラスミドとともに動物細胞Cos7にトランスフェクションした。結果は図1に示したとおりである。huCdc7に対する抗体による免疫沈降によってH37タンパク質は共沈殿されたが、H1およびH18タンパク質は共沈殿されなかった（図1：上段レーン2-4）。逆に、myc抗体を用いた免疫沈降により、huCdc7は myc標識のH37を共発現している細胞においてのみ共沈殿された（図1：下段レーン4）。この結果から、H37 cDNAのみがhuCdc7と効率よく相互作用するタンパク質をコードしていることが確認された。

【0027】

次いで、内在性のH37タンパク質について調べるために、H37のN端およびC端領域に対する抗体（抗H37N抗体、抗H37C抗体）をそれぞれ作成した。さらに、H37のC端オリゴペプチドに対する抗体（抗H37Cpep抗体）およびhuCdc7のC端オリゴペプチドに対する抗体（抗huCdc7Cpep抗体）も作成した。そして、各抗体と細胞内における内在性huCdc7およびH37との会合を測定した。結果は図2に示したとおりである。すなわち、H37に対する抗体はいずれもCos細胞で発現した90kDaのmyc標識H37タンパク質と特異的に反応した（図2：レーン1-4）。アフィニティ精製した抗ペプチド抗体を用いてヒトCEM細胞から調製した複合体を共沈殿することができた。huCdc7およびH37免疫沈殿物中にいずれもhuCdc7が含まれていることが抗huCdc7Cpep抗体を用いた免疫ブロットにより確認された（図2：レーン5および7）。このH37とhuCdc7との相互作用は、抗体作成の抗原として用いたペプチドと抗体とを予めpre-incubationすることによって完全に消失した（図2：レーン8）

。HeLa細胞の抽出液においては、Cdc7抗体およびH37抗体はいずれも、H37抗体と特異的に反応する80kDaの1本のポリペプチドを共沈殿することができた（図2：レーン9-13）。

【0028】

以上の結果から、内在性のhuCdc7とH37タンパク質が複合体として細胞内に存在していることが判明した。

実施例2

H37タンパク質がhuCdc7を活性化する能力があるか否かを調べるために、myc標識したH37と野生型あるいはキナーゼ失活型のhuCdc7をCos細胞で発現させて得たhuCdc7/H37キナーゼ複合体を、huCdc7抗体またはmyc抗体で免疫沈殿し、続いてGST-MCM3融合タンパク質を基質として用いて、*in vitro*のキナーゼ反応を測定した。結果は図3および図4に示したとおりである。野生型のhuCdc7の存在下では、huCdc7抗体の免疫沈降物およびmyc抗体の免疫沈降物の両方においてMCM3タンパク質の効率のよいリン酸化観察された（図3：レーン2および7）。さらに、もう2本のリン酸化タンパク質が観察され、それらはトランスフェクションされたhuCdc7およびmycH37であると同定された（データ示さず）。これらのリン酸化はキナーゼ失活型のhuCdc7では全く検出されないことから、huCdc7のキナーゼ活性がこれらのリン酸化に作用していることが確認された。ただし、キナーゼ失活型のhuCdc7もH37タンパク質と複合体を形成することができる（図3：レーン3および8、図4：レーン2および4）。さらにタンパクゲル電気泳動上でのH37タンパク質の移動度は野生型huCdc7が共発現されている場合は遅くなり、複数のバンドとして検出されたが、この移動度の変化はキナーゼ失活型huCdc7では観察されなかった（図4：レーン1および3）。移動度が遅くなっているバンドは脱リン酸化酵素処理により消失することから、それらは過リン酸化されたH37タンパク質であることが確認された（データ示さず）。また、昆虫細胞においてhuCdc7とH37タンパク質を共発現することにより、MCM2およびMCM3タンパク質を効率よくリン酸化することのできる極めて強いキナーゼ活性を再構成することができた（データ示さず）。

【0029】

以上の結果は、H37タンパク質がhuCdc7キナーゼを活性化し、さらにH37タンパク質自身がhuCdc7によりリン酸化されることを示している。

また、これらの実験条件下では、huCdc7触媒サブユニットのみが発現された場合には、内在性のH37タンパク質のレベルが低すぎるためにキナーゼ活性は僅かであった（図3：レーン4および9）。これらの事実から、H37タンパク質がhuCdc7の制御細胞ユニットをコードし、そのキナーゼ活性を特異的に活性化していることが確認された。

実施例3

H37タンパク質のアミノ酸配列（配列番号1）を検討した。その結果、図5および図6に示したように、出芽酵母Dbf4と33%の相同性を有するアミノ酸配列領域が見出された。この保存ドメイン（H37モチーフC）は、ラット、ショウジョウバエおよび分裂酵母で同定されたH37類似遺伝子にも存在する（図6）。また、H37のもう一つのアミノ酸領域（H37モチーフN）はラットおよびショウジョウバエのH37類似遺伝子に保存されていた。ただし、このH37モチーフNは出芽酵母のDbf4タンパク質には保存されていなかった（図6）。

【0030】

次に、huCdc7との結合に必須なH37タンパク質上の領域を決定するために、図7に示したような一連のH37N端およびC端欠失変異を作成し、各々をGal4活性化ドメインとの融合タンパク質として酵母内で発現させて、それぞれの欠失変異体とhuCdc7との相互作用をtwo-hybridアッセイで検討した。結果は図8に示したとおりである。N端の欠失の結果、N端255アミノ酸を削除してもhuCdc7との相互作用には影響を与えなかった（ΔN2）。しかしながら、さらにN端50アミノ酸を削除してH37モチーフCを欠失させるとhuCdc7との相互作用は完全に失われた（ΔN3）。

【0031】

一方、C端からの欠失においては、20アミノ酸を削除しただけでhuCdc7との結合能力が約60%まで低下した（ΔC）。さらに、243あるいは369アミノ

酸をC端から欠失させると ($\Delta P2$ および ΔB)、相互作用は全長クローンの約 10%までに低下した。N端の235 アミノ酸のみを含む $\Delta P1$ は huCdc7 と相互作用しなかった。ただし、 ΔB と $\Delta N2$ に共通に存在する 50 アミノ酸は huCdc7 との効率のよい相互作用のためには充分ではなかった (データ示さず)。

【0032】

以上に述べた H37 欠失誘導体の一部を huCdc7 とともに COS7 細胞内に共発現し、huCdc7 タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により確認した。その結果、two-hybrid assayの結果と同様に、全長 H37 タンパク質の他に、deltaB、deltaN2 の H37 欠失誘導体のみが huCdc7 と複合体を形成することが明らかにされた (図9)。

【0033】

以上の結果は、H37 モチーフCが H37 タンパク質と huCdc7 触媒サブユニットとの相互作用に必須であること、しかしそのみでは充分ではないことを示している。出芽酵母においては、H37 モチーフCを含む領域が Cdc7 との結合に充分であるということが既に報告されている (Mol. Cell. Biol. 15:6775-6782, 1996)。さらに、これらの欠失変異を用いて *in vitro* キナーゼ反応を行った結果、Dbf4 モチーフCを含むC端の419 アミノ酸のみでリン酸化活性で充分であることが判明した (データ示さず)。

実施例 4

種々のヒト組織および癌細胞における H37 mRNA の発現パターンをノーザンブロットにより検討した。結果は図10a、bに示したとおりである。H37 cDNA 特異的プローブにより、脳と腎臓以外の全ての組織において、また全ての癌細胞において、2.5 kbの転写産物が検出された。このことは、huCdc7 の mRNA は脳と腎臓においても比較的高い発現が観察されること (EMBO J. 16:4340-4351, 1997) とは対照的であった。検査した組織の中では、H37 mRNA の発現が最も高かったのは睾丸、次いで胸腺であり、この両組織は huCdc7 触媒サブユニットの発現が特に高い組織でもあることが発明者等によって報告されている (EMBO J. 16:4340-4351, 1997)。また、睾丸においては 6 kb と 4 kb の 2本の別の RNA バンドも検出された (図10a) が、これらの転写産物の正体は不

明である。さらに、H37 mRNAは、肺癌細胞A549を除いたほとんど全ての癌細胞において極めて高いレベルで発現していることが確認された（図10b）。このことは、活発な増殖能を有する細胞でもH37タンパク質の重要な役割を示している。

実施例5

H37の発現が細胞周期によって制御されているかどうかを検討するため、ヒト正常線維芽細胞WI38細胞を血清飢餓によりG0期に同調させ（図11）、トータルRNAを血清添加後の種々の時間に調整し、ノーザンブロットでH37 mRNAのレベルを検討した。結果は図12に示したとおりである。H37 mRNAレベルは、休止期の細胞では低く、細胞がG1-S境界に近づくに従って徐々に増加していき、血清添加後20時間で最大に達した。この図12に示した発現パターンは、増殖刺激によって誘導されることが知られているhuCdc6の転写産物の発現パターン（Mol. Cell. Biol. 15:4215-4224, 1995; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:142-147, 1997）に似ている。

【0034】

さらに、H37の細胞周期内で発現変動を調べるために、エルトリエーション法によりヒトCEM細胞を各細胞周期に分画し（図13）、ノーザンブロットを行った（図14）。その結果、H37 mRNAはG1期には低く、G1後期からS期にかけて上昇し、S期の間は高く維持され、G2期にやや減少するがまだ高く維持されていることが示された。また、ノコダゾールによりHeLa細胞をG2後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた実験（図15）においてもH37 mRNAはG2からG1への移行に従って減少し、S期への移行の際に再び上昇することが示された（図16）。Cdc6の発現も同様にG1からS期への移行に伴って上昇するが、S期が進行するにつれて減少し、G2期には低く抑えられる点がH37とは異なる。この結果は、H37 mRNAの発現は進行する細胞周期のなかでも変動し、それが機能すると考えられるS期に最大になることを示す。

【0035】

H37の発現をさらに調べるために動物細胞内におけるH37タンパク質の細胞内局在を測定した。2種類のH37特異的抗体を用いて間接蛍光抗体法を行っ

た結果、HeLa細胞とWI38細胞の両方において、内在性H37タンパク質は核内に非常に明確な数々のスポットとして観察された(図17)。

これらの結果および発明者らがすでに報告しているhuCdc7触媒サブユニットの核内局在(EMBO J. 16:4340-4351, 1997)とあわせて、huCdc7/H37複合体は核に局在するキナーゼであり、その制御細胞ユニットは細胞周期のシグナルに依存して発現していることが確認された。

実施例 6

細胞周期のG1-S移行における内在性H37タンパク質の機能を抗体微量注入法により検討した。H37タンパク質のN端305アミノ酸に対する抗体(抗H37N抗体)およびC端のオリゴペプチドに対する抗体(抗H37Cpep抗体)をアフィニティ精製し、これらの抗体をヒト唇由来の正常線維芽細胞(KD細胞)に微量注入した。KD細胞は予め血清飢餓によってG0期に停止させておき、血清再添加によって同調的に細胞周期へと進行させたものを使用した。ヌクレオチド誘導体であって、細胞内に取り込まれるBrdU陽性の細胞数を測定することにより、どれくらいの画分の細胞が決定添加後の種々の時期にS期に存在するかを調べた。結果は図18に示したとおりである。細胞は血清添加後約18時間でDNA合成を始め、24時間後にはほぼ90%の細胞がS期に入っていることを確認した。

【0036】

従って、この実施例では、細胞がまだG1後期の状態である血清添加後12時間の時点で抗体を微注入し、ほぼ完全にS期に入ったと考えられる26時間後の時点で細胞を固定してBrdU陽性細胞を計測した。結果は図19に示したとおりである。抗H37N抗体を微注入した細胞の70%がS期に移行することができなかったのに対し、コントロール抗体による影響はほとんど見られなかった。また、抗H37Cpep抗体の微注入によっても抗H37N抗体と同等あるいはそれ以上のS期移行阻害効果が観察された。しかも、抗H37Cpep抗体作成のための抗原であるペプチドと抗H37Cpep抗体とを同時に細胞内に微注入した場合には、70%以上の細胞がS期に移行することができた。

【0037】

図20は、BrdUと微注入抗体の染色例である。抗体は細胞がG1中期から後期にある段階で微注入されており、この時期にはH37タンパク質の発現は低いと考えられる。微注入された抗体は、新しく合成されたH37タンパク質に効率よく結合し、その結果、H37タンパク質の核内への移行を阻害すると考えられる。これらの結果は、H37の機能、すなわちhuCdc7/H37複合体の機能が動物細胞のS期進行に要求されることを強く示唆する。

【0038】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法が提供される。これによって、各種のヒト疾患の治療に用いられる幹細胞等の必要量を調整することが可能となり、あるいは癌細胞の増殖抑制のための新規な手段を開発することが可能となる。

【0039】

【配列表】

<110> 出願人氏名：科学技術振興事業団

<120> 発明の名称：ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードする
cDNA

<160> 配列の総数：4

<210> 配列番号：1

<211> 配列の長さ：674

<212> 配列の型：PRT

<213> ホモサピエンス

<400> 配列

Met	Asn	Ser	Gly	Ala	Met	Arg	Ile	His	Ser	Lys	Gly	His	Phe	Gln	Gly
1					5					10				15	
Gly	Ile	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Lys	Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu

20	25	30	
Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly			
35	40	45	
Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu			
50	55	60	
Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser			
65	70	75	80
Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala			
85	90	95	
Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr			
100	105	110	
Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe			
115	120	125	
Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu			
130	135	140	
Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser			
145	150	155	160
Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg			
165	170	175	
Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser			
180	185	190	
Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln			
195	200	205	
Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp			
210	215	220	
Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro			
225	230	235	240
Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp			
245	250	255	

Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln
 260 265 270
 Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys
 275 280 285
 Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu
 290 295 300
 Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln
 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe
 325 330 335
 Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys Arg Ile Lys
 240 245 350
 Tyr Ser Val Gly Ser Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys
 355 360 365
 Thr Glu Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp
 370 375 380
 Cys Gln Glu Asp Asp Thr Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys
 385 390 395 400
 Glu Thr Gln Glu Thr Glu Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile
 405 410 415
 Pro His Pro Ser Asn Glu Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn
 420 425 430
 Lys Cys Ser Met Leu Ser Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe
 435 440 445
 Thr Gln Leu Pro Leu His Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile
 450 455 460
 Ser Glu His Thr Leu Ser Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp
 465 470 475 480
 His Tyr Lys Cys Asn Ile Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser

485	490	495
Thr Asp Asn Ser Gly Ser Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu		
500	505	510
Phe Pro Ala Lys Asp Leu Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr		
515	520	525
His Asp Ser Gly Leu Ile Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr		
530	535	540
Val Gln Ala Lys Ala Pro Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu		
545	550	555
Cys Asp Phe Lys Asn Met Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg		
565	570	575
Lys Val Lys Ile Ile Leu Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro		
580	585	590
Asn Ala Glu Phe Asp Lys Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn		
595	600	605
Arg Ile Cys Ser Ser Pro Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr		
610	615	620
Ser Glu Glu Lys Ser Glu Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys		
625	630	635
Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Trp Glu Glu Glu Asn Ser Asp		
645	650	655
Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr		
660	665	670
Gly Phe		
674		

<210> 配列番号 : 2

<211> 配列の長さ : 234

<212> 配列の型 : PRT

<213> ホモサピエンス

<400> 配列

Met	Asn	Ser	Gly	Ala	Met	Arg	Ile	His	Ser	Lys	Gly	His	Phe	Gln	Gly
1				5					10					15	
Gly	Ile	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Lys	Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu
			20					25				30			
Lys	Thr	Asp	Asn	Arg	Pro	Glu	Lys	Ser	Lys	Cys	Lys	Pro	Leu	Trp	Gly
		35					40					45			
Lys	Val	Phe	Tyr	Leu	Asp	Leu	Pro	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Glu	Lys	Leu
	50					55					60				
Gln	Lys	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Glu	Glu	Phe	Leu	Ser
65					70				75					80	
Lys	Asp	Ile	Ser	Tyr	Leu	Ile	Ser	Asn	Lys	Lys	Glu	Ala	Lys	Phe	Ala
					85				90				95		
Gln	Thr	Leu	Gly	Arg	Ile	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ala	Tyr
		100					105					110			
Thr	Ala	Glu	Thr	Thr	Ser	Pro	His	Pro	Ser	His	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe
		115					120					125			
Lys	Ser	Pro	Asp	Thr	Val	Cys	Leu	Ser	Arg	Gly	Lys	Leu	Leu	Val	Glu
		130				135					140				
Lys	Ala	Ile	Lys	Asp	His	Asp	Phe	Ile	Pro	Ser	Asn	Ser	Ile	Leu	Ser
145					150					155				160	
Asn	Ala	Leu	Ser	Trp	Gly	Val	Lys	Ile	Leu	His	Ile	Asp	Asp	Ile	Arg
					165				170				175		
Tyr	Tyr	Ile	Glu	Gln	Lys	Lys	Lys	Glu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Lys	Lys	Ser
		180					185					190			
Ser	Thr	Ser	Val	Arg	Asp	Gly	Gly	Lys	Arg	Val	Gly	Ser	Gly	Ala	Gln
		195					200					205			
Lys	Thr	Arg	Thr	Gly	Arg	Leu	Lys	Lys	Pro	Phe	Val	Lys	Val	Glu	Asp
		210				215						220			

Met Ser Gln Ser Pro Ala Val His Leu Met

225 230 234

<210> 配列番号 : 3

<211> 配列の長さ : 2 7 8 0

<212> 配列の型 : D N A

<213> ホモ - サピエンス

<400> 配列

AATTCGGCAC GAGCTCTCTG AGGCTGCGCC AAGACCTGAA GCGGCGGACC GAGAGCCCGG	60
GTCTGAGACT GAGAGAGCAA CGGAATGGAG GCGGGGTAGA GGCGGAAACA CAACCTGCAG	120
GGCCAGAGCG AGGCGCGAGA AGGACGGCGG CGTGAGGGGG CGGGGCGCGC AGCGCGAGAA	180
GGCAGGCACG AGGGGCGAGC GCGAGGCGGG GCACGGCGCG TGGCGTGAGA CGGGGCGGGG	240
CGCGCGTATC GGCGCCGCGG CCGCGTGACG CGTTTTCAAA TCTTCAACCG CCGCAGCCCA	300
CTCGTTTGTG CTTTGCGCCT TCCTCCTCCG CGCCTTGGAG CCGGATCCGG CCCCAGAAAC	360
CCGACCTGCA GACGCGGTAC CTCTACTGCG TAGAGGCCGT AGCTGGCGGA AGGAGAGAGG	420
CGGCCGTCCCT GTCAACAGGC CGGGGGAAGC CGTGCTTTCG CGGCTGCCCC GTGCGACACT	480
TTCTCCGGAC CCAGCATGTA GGTGCCGGGC GACTGCCATG AACTCCGGAG CCATGAGGAT	540
CCACAGTAAA GGACATTTCC AGGGTGAAT CCAAGTCAAA AATGAAAAAA ACAGACCATC	600
TCTGAAATCT CTGAAAACCTG ATAACAGGCC AGAAAAATCC AAATGTAAGC CACTTTGGGG	660
AAAAGTATTT TACCTTGACT TACCTTCTGT CACCATATCT GAAAAACTTC AAAAGGACAT	720
TAAGGATCTG GGAGGGCGAG TTGAAGAATT TCTCAGCAA GATATCAGTT ATCTTATTTT	780
AAATAAGAAG GAAGCTAAAT TTGCACAAAC CTTGGGTGCA ATTTCTCCTG TACCAAGTCC	840
AGAATCTGCA TATACTGCAG AAACCACTTC ACCTCATCCC AGCCATGATG GAAGTTCATT	900
TAAGTCACCA GACACAGTGT GTTAAAGCAG AGGAAAATTA TTAGTTGAAA AAGCTATCAA	960
GGACCATGAT TTTATTCCTT CAAATAGTAT ATTATCAAAT GCCTTGTCAT GGGGAGTAAA	1020
AATTCTTCAT ATTGATGACA TTAGATACTA CATTGAACAA AAGAAAAAAG AGTTGTATTT	1080
ACTCAAGAAA TCAAGTACTT CAGTAAGAGA TGGGGGCAAA AGAGTTGGTA GTGGTGCACA	1140
AAAAACAAGA ACAGGAAGAC TCAAAAAGCC TTTTGTAAAG GTGGAAGATA TGAGCCAACT	1200
TTATAGGCCA TTTTATCTTC AGCTGACCAA TATGCCTTTT ATAAATTATT CTATTCAGAA	1260
GCCCTGCAGT CCATTTGATG TAGACAAGCC ATCTAGTATG CAAAAGCAAA CTCAGGTAA	1320

ACTAAGAATC CAAACAGATG GCGATAAGTA TGGTGAACCC TCAATTCAAC TCCAGTTGAA	1380
AGAGAAGAAG AAAAAAGGAT ATTGTGAATG TTGCTTGCAG AAATATGAAG ATCTAGAAAC	1440
TCACCTTCTA AGTGAGCAAC ACAGAAACTT TGCACAGAGT AACCAGTATC AAGTTGTTGA	1500
TGATATTGTA TCTAAGTTAG TTTTGTGACTT TGTGGAATAT GAAAAGGACA CACCTAAAAA	1560
GAAAAAGAATA AAATACAGTG TTGGATCCCT TTCTCCTGTT TCTGCAAGTG TCCTGAAAAA	1620
GA CTGAACAA AAGGAAAAAG TGGAATTGCA ACATATTTCT CAGAAAGATT GCCAGGAAGA	1680
TGATACAACA GTGAAGGAGC AGAATTTCTT GTATAAAGAG ACCCAGGAAA CTGAAAAAAA	1740
GCTCCTGTTT ATTTTCTGAGC CCATCCCCCA CCCTTCAAAT GAATTGAGAG GGCTTAATGA	1800
GAAAAATGAGT AATAAATGTT CCATGTTAAG TACAGCTGAA GATGACATAA GACAGAATTT	1860
TACACAGCTA CCTCTACATA AAAACAAACA GGAATGCATT CTTGACATTT CCGAACACAC	1920
ATTAAGTGAA AATGACTTAG AAGAATAAG GGTAGATCAC TATAAATGTA ACATACAGGC	1980
ATCTGTACAT GTTTCTGATT TCAGTACAGA TAATAGTGA TCTCAACCAA AACAGAAGTC	2040
AGATACTGTG CTTTTTCCAG CAAAGGATCT CAAGGAAAAAG GACCTTCATT CAATATTTAC	2100
TCATGATTCT GGTCTGATAA CAATAAACAG TTCACAAGAG CACCTAACTG TTCAGGCAAA	2160
GGCTCCATTC CATACTCCTC CTGAGGAACC CAATGAATGT GACTTCAAGA ATATGGATAG	2220
TTTACCTTCT GGTAAAATAC ATCGAAAAGT GAAAATAATA TTAGGACGAA ATAGAAAAGA	2280
AAATCTGGAA CCAAATGCTG AATTTGATAA AAGAACTGAA TTTATTACAC AAGAAGAAAA	2340
CAGAATTTGT AGTTCACCGG TACAGTCTTT ACTAGACTTG TTCAGACTA GTGAAGAGAA	2400
ATCAGAATTT TTGGGTTTCA CAAGCTACAC AGAAAAGAGT GGTATATGCA ATGTTTTAGA	2460
TATTTGGGAA GAGGAAAATT CAGATAATCT GTTAACAGCG TTTTCTCGT CCCCTTCAAC	2520
TTCTACATTT ACTGGCTTTT AGAATTTAAA AAATGCATAC TTTTCAGAAG TGATAAGGAT	2580
CATATTCTTG AAATTTTAT AAATATGTAT GGAAATTCTT AGGATTTTTT TACCAGCTTT	2640
GTTTACAGAC CCAAATGTAA ATATTAATAA TAAATATTTG CAATTTTCTA CAGAATTGAA	2700
TACCTGTAA AGAAAAATTA CAGAATAAAC TTGTGACTGG TCTTGTTTTA CATTAAAAAA	2760
AAAAAAAAAA AAAACTCGAG	2780

<210> 配列番号 : 4

<211> 配列の長さ : 2 7 1 9

<212> 配列の型 : D N A

<213> ホモ - サピエンス

<400> 配列

AATTCGGCAC GAGCTCTCTG AGGCTGCGCC AAGACCTGAA GCGGCGGACC GAGAGCCCGG	60
GTCTGAGACT GAGAGAGCAA CGGAATGGAG GCGGGGTAGA GGCGGAAACA CAACCTGCAG	120
GGCCAGAGCG AGGCGCGAGA AGGACGGCGG CGTGAGGGGG CGGGGCGCGC AGCGCGAGAA	180
GGCAGGCACG AGGGGCGAGC GCGAGGCGGG GCACGGCGCG TGGCGTGAGA CGGGGCGGGG	240
CGCGCGTATC GCGCGCGCGG CCGCGTGACG CGTTTTCAAA TCTTCAACCG CCGCAGCCCA	300
CTCGTTTGTG CTTTGCGCCT TCCTCCTCCG CGCCTTGAG CCGGATCCGG CCCCGAAAC	360
CCGACCTGCA GACGCGGTAC CTCTACTGCG TAGAGGCCGT AGCTGGCGGA AGGAGAGAGG	420
CGGCCGTCCT GTCAACAGGC CGGGGAAGC CGTGCTTTCG CGGCTGCCCG GTGCGACACT	480
TTCTCCGGAC CCAGCATGTA GGTGCCGGGC GACTGCCATG AACTCCGGAG CCATGAGGAT	540
CCACAGTAAA GGACATTTCC AGGGTGAAT CCAAGTCAAA AATGAAAAAA ACAGACCATC	600
TCTGAAATCT CTGAAAACG ATAACAGGCC AGAAAAATCC AAATGTAAGC CACTTTGGGG	660
AAAAGTATTT TACCTTGACT TACCTTCTGT CACCATATCT GAAAACTTC AAAAGGACAT	720
TAAGGATCTG GGAGGGCGAG TTGAAGAATT TCTCAGCAAA GATATCAGTT ATCTTATTTT	780
AAATAAGAAG GAAGCTAAAT TTGCACAAAC CTGGGTCGA ATTTCTCCTG TACCAAGTCC	840
AGAATCTGCA TATACTGCAG AAACCACTTC ACCTCATCCC AGCCATGATG GAAGTTCATT	900
TAAGTCACCA GACACAGTGT GTTAAAGCAG AGGAAAATTA TTAGTGAAA AAGCTATCAA	960
GGACCATGAT TTTATTCCTT CAAATAGTAT ATTATCAAAT GCCTTGTCAT GGGGAGTAAA	1020
AATTCTTCAT ATTGATGACA TTAGATACTA CATTGAACAA AAGAAAAAAG AGTTGTATTT	1080
ACTCAAGAAA TCAAGTACTT CAGTAAGAGA TGGGGGCAAA AGAGTTGGTA GTGGTGCACA	1140
AAAAACAAGA ACAGGAAGAC TCAAAAAGCC TTTTGTAAAG GTGGAAGATA TGAGCCAAAG	1200
CCCTGCAGTC CATTTGATGT AGACAAGCCA TCTAGTATGC AAAAGCAAAC TCAGGTAAAA	1260
CTAAGAATCC AAACAGATGG CGATAAGTAT GGTGGAACCT CAATTCAACT CCAGTTGAAA	1320
GAGAAGAAGA AAAAAGGATA TTGTGAATGT TGCTTGCAGA AATATGAAGA TCTAGAACT	1380
CACCTTCTAA GTGAGCAACA CAGAACTTT GCACAGAGTA ACCAGTATCA AGTTGTTGAT	1440
GATATTGTAT CTAAGTTAGT TTTTGACTTT GTGGAATATG AAAAGGACAC ACCTAAAAAG	1500
AAAAAGAATA AATACAGTGT TGGATCCCTT TCTCCTGTTT CTGCAAGTGT CCTGAAAAAG	1560
ACTGAACAAA AGGAAAAAGT GGAATTGCAA CATATTTCTC AGAAAGATTG CCAGGAAGAT	1620
GATACAACAG TGAAGGAGCA GAATTCCTG TATAAAGAGA CCCAGGAAAC TGAAAAAAG	1680

CTCCTGTTTA TTTCAGAGCC CATCCCCAC CCTTCAAATG AATTGAGAGG GCTTAATGAG	1740
AAAATGAGTA ATAAATGTTC CATGTTAAGT ACAGCTGAAG ATGACATAAG ACAGAATTTT	1800
ACACAGCTAC CTCTACATAA AAACAAACAG GAATGCATTC TTGACATTTT CGAACACACA	1860
TTAAGTGAAA ATGACTTAGA AGAACTAAGG GTAGATCACT ATAAATGTAA CATACAGGCA	1920
TCTGTACATG TTTCTGATTT CAGTACAGAT AATAGTGGAT CTCAACCAAA ACAGAAGTCA	1980
GATACTGTGC TTTTCCAGC AAAGGATCTC AAGGAAAAGG ACCTTCATTC AATATTTACT	2040
CATGATTCTG GTCTGATAAC AATAAACAGT TCACAAGAGC ACCTAACTGT TCAGGCAAAG	2100
GCTCCATTCC ATACTCCTCC TGAGGAACCC AATGAATGTG ACTTCAAGAA TATGGATAGT	2160
TTACCTTCTG GTAAAATACA TCGAAAAGTG AAAATAATAT TAGGACGAAA TAGAAAAGAA	2220
AATCTGGAAC CAAATGCTGA ATTTGATAAA AGAACTGAAT TTATTACACA AGAAGAAAAC	2280
AGAATTTGTA GTTCACCGGT ACAGTCTTTA CTAGACTTGT TTCAGACTAG TGAAGAGAAA	2340
TCAGAATTTT TGGGTTTCAC AAGCTACACA GAAAAGAGTG GTATATGCAA TGTTTTAGAT	2400
ATTTGGGAAG AGGAAAATTC AGATAATCTG TTAACAGCGT TTTTCTCGTC CCCTTCAACT	2460
TCTACATTTA CTGGCTTTTA GAATTTAAAA AATGCATACT TTTCAGAAAGT GATAAGGATC	2520
ATATTCTTGA AATTTTATA AATATGTATG GAAATTCTTA GGATTTTTTT ACCAGCTTTG	2580
TTTACAGACC CAAATGTAAA TATTAAAAAT AAATATTTGC AATTTTCTAC AGAATTGAAT	2640
ACCTGTAAAA GAAAAATTAC AGAATAAACT TGTGACTGGT CTTGTTTAC ATTAACAAAA	2700
AAAAAAAAAA AACTCGAG	2719

【図面の簡単な説明】

【図 1】

動物細胞で発現させた huCdc7 と H37 の共免疫沈降を測定したウェスタンブロットティングの結果である。レーン 1 - 4 : 免疫沈降物、レーン 5 - 7 : 細胞総抽出液、上段および中段 : huCdc7 抗体 No.1 により免疫沈降したもの、下段 : myc 抗体により免疫沈降したもの。抽出液は、huCdc7 と H1 (レーン 2、5)、H18 (レーン 3、6) H37 (レーン 4、7) または huCdc7 のみ (レーン 1) をトランスフェクションした Cos7 細胞から作成した。ウェスタンブロットティングは、抗 myc 抗体 (上段) または抗 huCdc7 抗体 No.1 (中段および下段) を用いて行った。

【図 2】

H37タンパク質に対する抗体と細胞内における内在性huCdc7とH37との会合を測定したウェスタンブロッティングの結果である。myc 標識したH37をトランスフェクションしたCos7から作成した核抽出液を、抗H37C抗体（レーン1）、抗H37N抗体（レーン2）、抗H37C-pep 抗体（レーン3）あるいは抗myc 抗体（レーン4）によりブロットした。矢印は、myc タグに加えて5'非コード領域に由来する63アミノ酸を含んでいるH37タンパク質の位置を示している。CEM細胞から作成した抽出液を抗huCdc7C-pep抗体（レーン5、6）、あるいは抗H37C-pep抗体（レーン7、8）により免疫沈降し、タンパクゲル電気泳動したのち、huCdc7モノクローナル抗体（4A8）を用いてブロットした。－と＋は、免疫沈降の際にそれぞれの抗原が存在するか否かを示している。レーン9-13はHeLa細胞の核抽出液のウェスタンブロッティングであり、抗huCdc7抗体No.1（レーン9）、抗huCdc7モノクローナル抗体4A8（レーン10）、抗H37C抗体（レーン11）、抗H37N抗体（レーン12）、抗H37C-pep抗体（レーン13）を用いている。

【図3】

抗huCdc7抗体No.1（レーン1-5）または抗myc 抗体（レーン6-10）を用いてmyc 標識H37のみ（レーン1、6）、myc 標識H37と野生型huCdc7（レーン2、7）、myc 標識H37とキナーゼ失活型huCdc7（レーン3、8）をトランスフェクションしたCos7細胞の抽出液から免疫沈降を行った結果を示す。コントロールとして野生型huCdc7のみ（レーン4、9）およびキナーゼ失活型huCdc7（レーン5、10）も同様に測定した。

【図4】

野生型huCdc7の共発現により誘導されるH37の電気泳動上での移動度の変化である。野生型またはキナーゼ失活型のhuCdc7をmyc 標識H37とともに発現しているCos7細胞から抽出液を作製し、抗huCdc7抗体No.1（レーン1、2）または抗myc 抗体（レーン3、4）で免疫沈降し、抗myc 抗体（上段）または抗huCdc7抗体（下段）でブロットした。試料は8%SDS-PAGEタンパクゲルに流した。

【図5】

配列番号 1 と同一の全長 H 3 7 タンパク質のアミノ酸配列である。

【図 6】

Dbf 4 と H 3 7 の構造を比較した模式図と 2 つの保存領域のアミノ酸配列の比較である。Dbf 4 上の両向きの矢印で示された領域は、Cdc 7 との相互作用に充分であると報告されている領域である。H 3 7 上の両向き矢印で示された領域は、それぞれ huCdc 7 との相互作用に必須である（しかし充分ではない）領域と、huCdc 7 キナーゼ活性の促進に充分な領域を示す。

【図 7】

H 3 7 タンパク質の N 端および C 端欠失変異の模式図である。それぞれのバー端部の数字は欠失の端のアミノ酸番号（配列番号 1 に対応）を示す。斜線領域は Dbf 4 モチーフ C を示す。

【図 8】

H 3 7 欠失変異体の huCdc 7 との two-hybrid アッセイにおける lacZ 活性を示す。

【図 9】

H 3 7 欠失変異体の一部を huCdc 7 とともに COS 7 細胞内に共発現し、huCdc 7 タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により検討した結果を示す。

【図 10】

a は種々の臓器での H 3 7 mRNA 発現のサザン解析の結果であり、b は種々の癌細胞での H 3 7 mRNA 発現のノザン解析の結果である。

【図 11】

休止期にある WI 38 細胞を 10% 血清添加により増殖刺激し、様々な時間経過においてその DNA 含量を FACS で解析した結果を示す。

【図 12】

図 11 に示した細胞から RNA を抽出し、H 3 7 および huCdc 6 の発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれの mRNA の相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図 13】

エルトリエーション法によるヒト CEM 細胞の各細胞周期分画を示したグラフ

図である。

【図 14】

図 13 に示した各分画の H 3 7 および Cyclin E の発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれの mRNA の相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図 15】

ノコダゾールにより HeLa 細胞を G 2 後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた場合の DNA 含量を FACS で解析した結果を示す。

【図 16】

図 15 に示した各細胞周期における H 3 7 および Cyclin E の発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれの mRNA の相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図 17】

間接蛍光抗体法による H 3 7 の細胞局在の解析結果を示す。使用した抗体は、抗 H 3 7 C 抗体（A）、抗 H 3 7 N 抗体（C）、コントロール抗体（E）、B、D、F は DAPI 染色像である。

【図 18】

血清刺激後の KD 細胞における DNA 合成の誘導の時間的变化を BrdU 取り込み量を指標として調べた結果を示す。

【図 19】

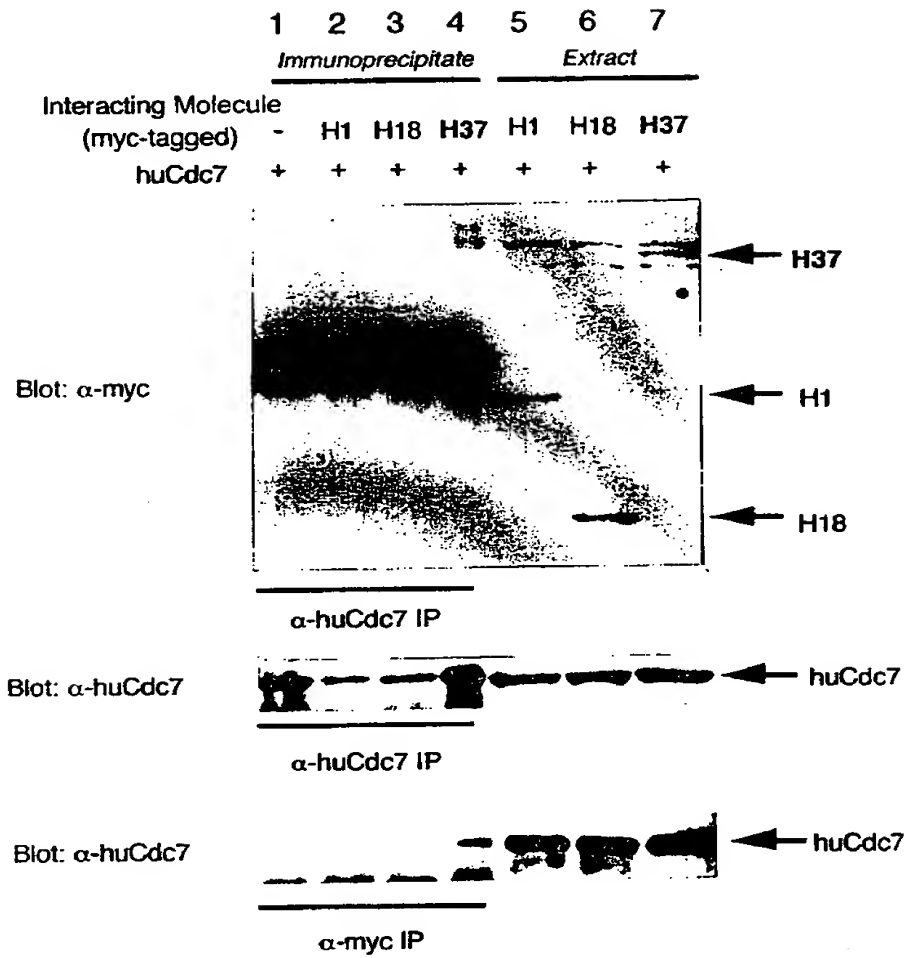
血清飢餓により同調した KD 細胞に、血清添加後 12 時間の時点で各抗体を微注入し、さらに 16 時間後に BrdU 取り込み量を測定して計測した DNA 合成を行っている細胞の割合を示す。

【図 20】

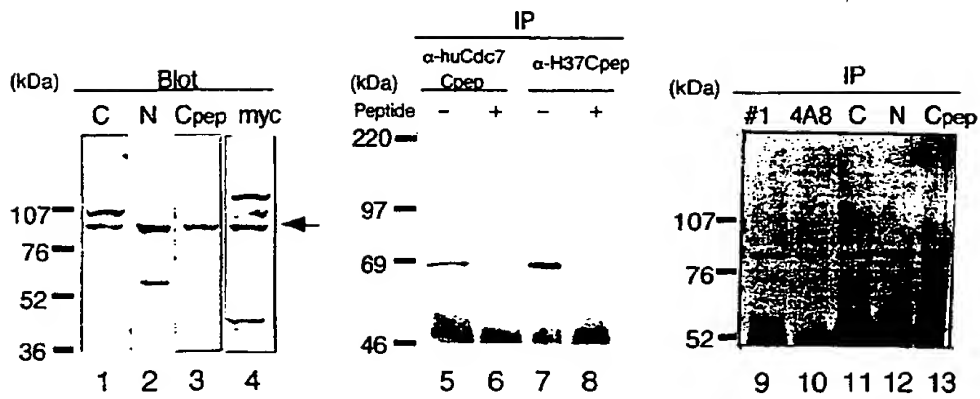
抗 H 3 7 C-pep 抗体（左側）または抗 H 3 7 C-pep とペプチドの混合物を微注入された細胞を例示した顕微鏡写真である。取り込まれた BrdU（上段）、注入された抗体（中段）、細胞（下段）を示す。

【書類名】 図面

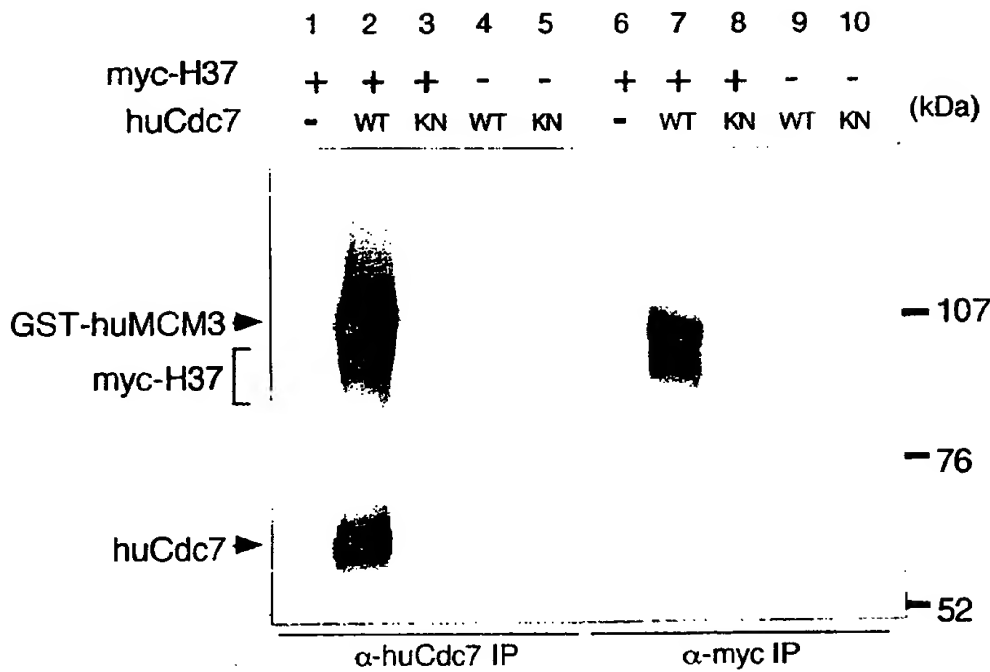
【図 1】



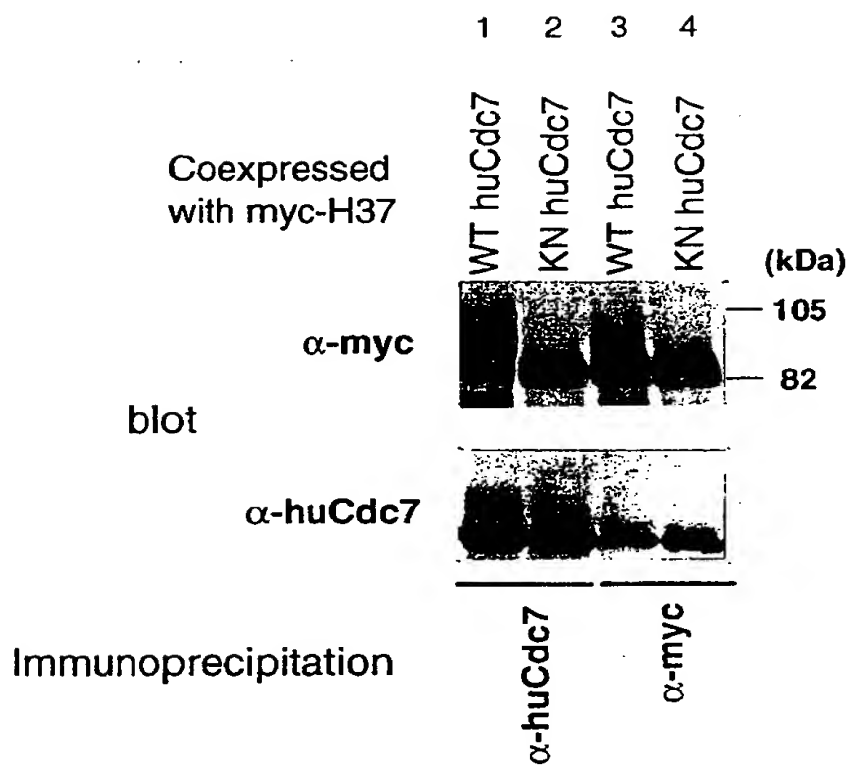
【図 2】



【図 3】



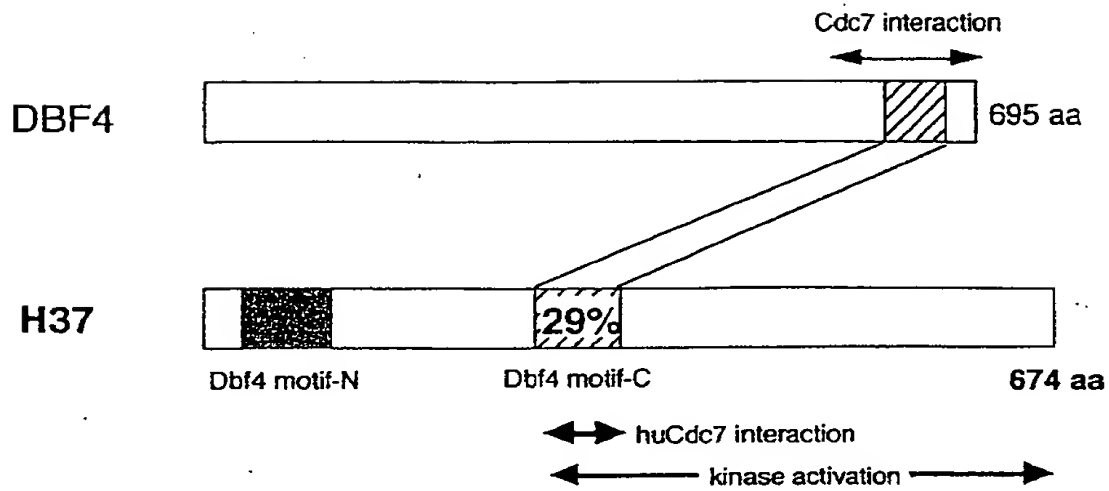
【図 4】



【図 5】

1	10	20	30	40	50	60
MNSGAMRIHSKGFQGGIQVKNEKNRPSLKS <u>SLKTDNRPEKSKCKPLWGKV FYLDLP SVTI</u>						
				Dbf4 motif-N		
61	70	80	90	100	110	120
<u>SEKLOKDIKDLGGRVEEFLSKDISY LISNKK EAKFAOTLGRISPVPSPESAYTAETTSPH</u>						
121	130	140	150	160	170	180
PSHDGSSFKSPDTVCLSRGKLLVEKAIKDHDFIPSN SILSNALSWG VKILHIDDIRYYIE						
181	190	200	210	220	230	240
QKKKELYLLKKSSTSVRDGGKRVGSGAQKTRTGRLKKPFVKVEDMSQLYRPFY LQLTNMP						
241	250	260	270	280	290	300
FINYSIQKPCSPFDVDPKSSMQK <u>QTQVKLRIQTDGDKYGGTSIQ LQLKEKKKKGYCECCL</u>						
				Dbf4 motif-C		
301	310	320	330	340	350	360
<u>QKYEDLETHLLSEQHRNFAQSNQYQVVDIVSKLVDFVEYEKDTPKKKRIKYSVGSLSLSP</u>						
361	370	380	390	400	410	420
VSASVLKKTEQKEKVELQHISQKDCQEDDTTVKEQNFLYKETQETEKLLFISEPIPHPS						
421	430	440	450	460	470	480
NELRGLNEKMSNKC SMLSTAEDDIRQNFTQLPLHKNKQECILDISEHTLSENDLEELRVD						
481	490	500	510	520	530	540
HYKCNIQASVHVSDFDSTDNSGSQPKQSDTVLFP AKDLKEKDLHSIFTHD SGLITINSSQ						
541	550	560	570	580	590	600
EHLTVQAKAPFHTPPEEPNECDFKNMDSLPSGKIHRKVKIILGRNRKENLEPNAEFDKRT						
601	610	620	630	640	650	660
EPITQEENRICSSPVQSLDLFQTSEEKSEFLGFTSYTEKSGICNVLDIWEENE SDNLLT						
661	670	674				
AFFSSPSTSTFTGF*						

【図 6】



Dbf4 motif-N

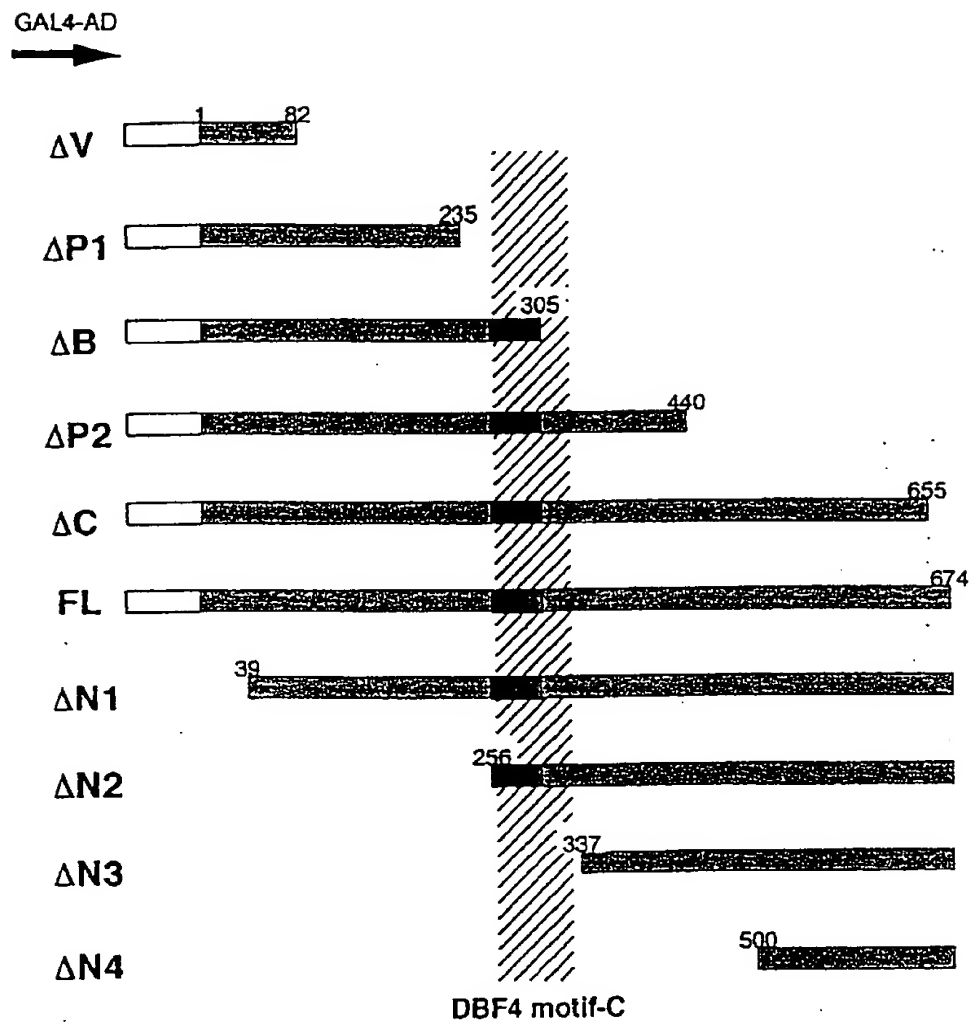
H37 32: **LTIDNFRKSK** **OKPIWGGV** **EYIDPSV** **ITSEKI** **OKDINDI** **GGRVIEFL** **SKDTSYL** **ISNKK** 91
 mu-H37 : **LKADNELKSK** **YKPUMGR** **ITFYIDPS** **ITICEKI** **OKDIEI** **GGRVIEFL** **SKDISYFV** **SNKK**
 Dm-H37 : **TPPKVKV** **IKSK** **RPICHFK** **YLDICDHQLAKRIES** **DIKALGCHLE** **FLSD** **THFVTD** **KP**
 *** ** **** * * *

huDbf4N 92: **EAKFAQT** 98
 muDbf4N : **EAKYAQT**
 DmDbf4N : **EVIGGTS**
 *

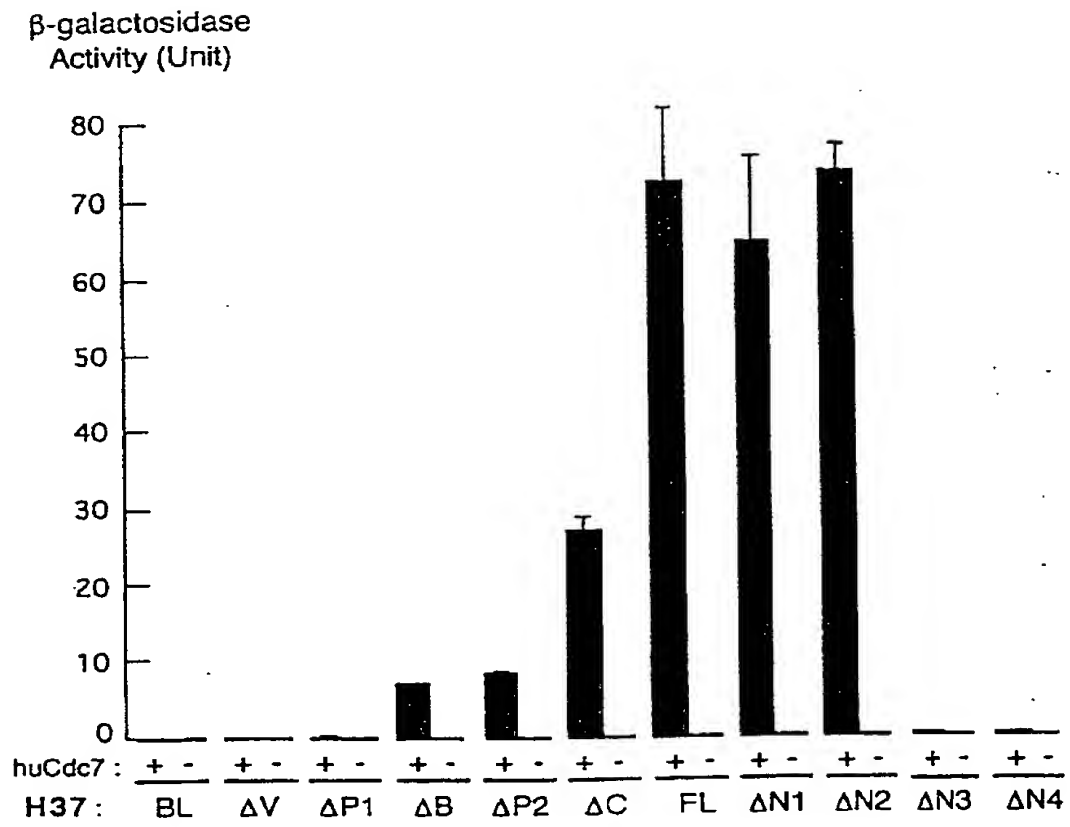
Dbf4 motif-C

H37 263: **QTVKLRIQTDGDKYGG** **SIQLQLKE** **KKKGYCF** **CLQKYEDLETHL** **SECHRNFAQSN** 322
 mu-H37 : **KQAQPKLRINMDGDKC** **GIPVQLQLKEK** **KKGYCF** **CLQKYEDLETHL** **SECHRNFAQSN**
 Dm-H37 : **PSLQELKKQSAIPNSPRSNCREPIDSSER** **QCGVCS** **IKLEYDILNTHL** **OSKDI** **ELFAKNS**
 Dbf4 619: **KKSTSTNVT** **LHFNAQTACT** **IAQPVKKETV** **NSGYCL** **NRVKYSE** **LECHIVSL** **CLSAE** **N** 677
 * * * * *

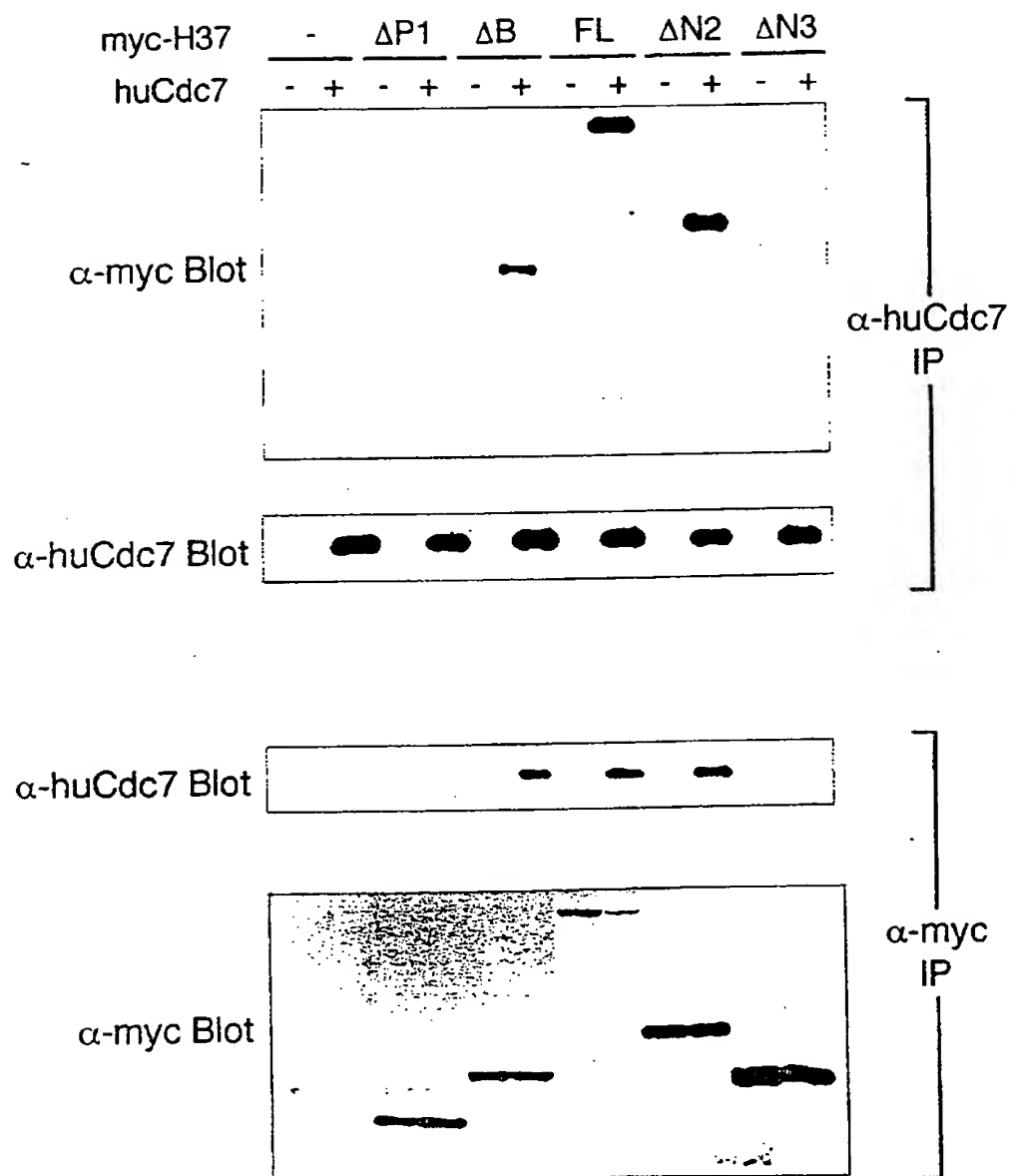
【図 7】



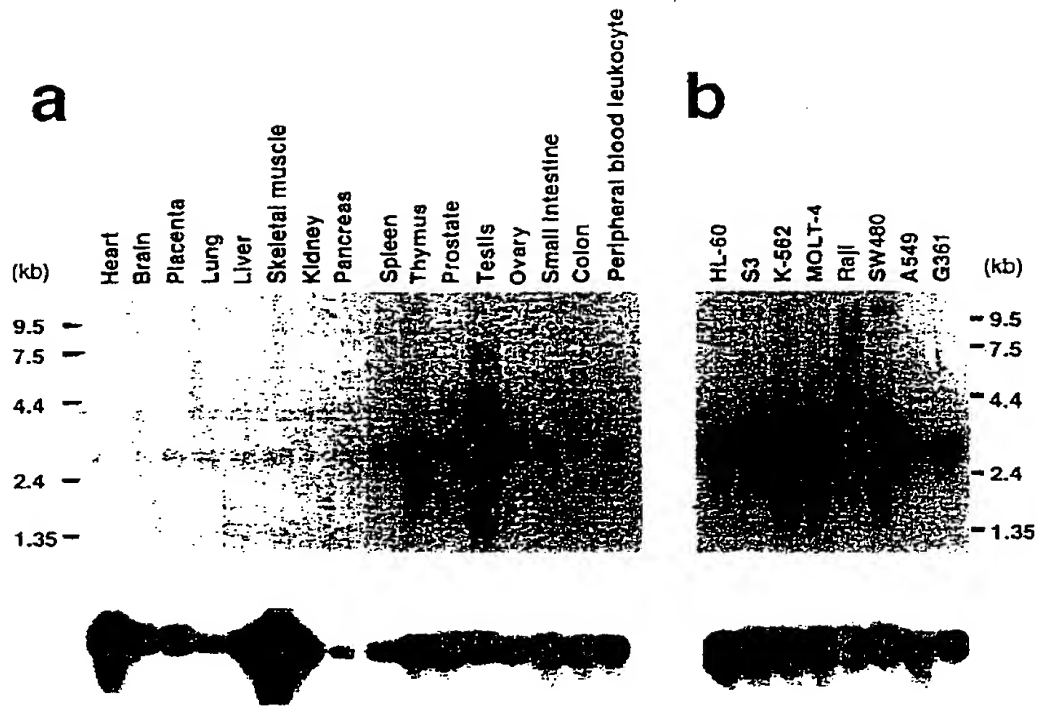
【図 8】



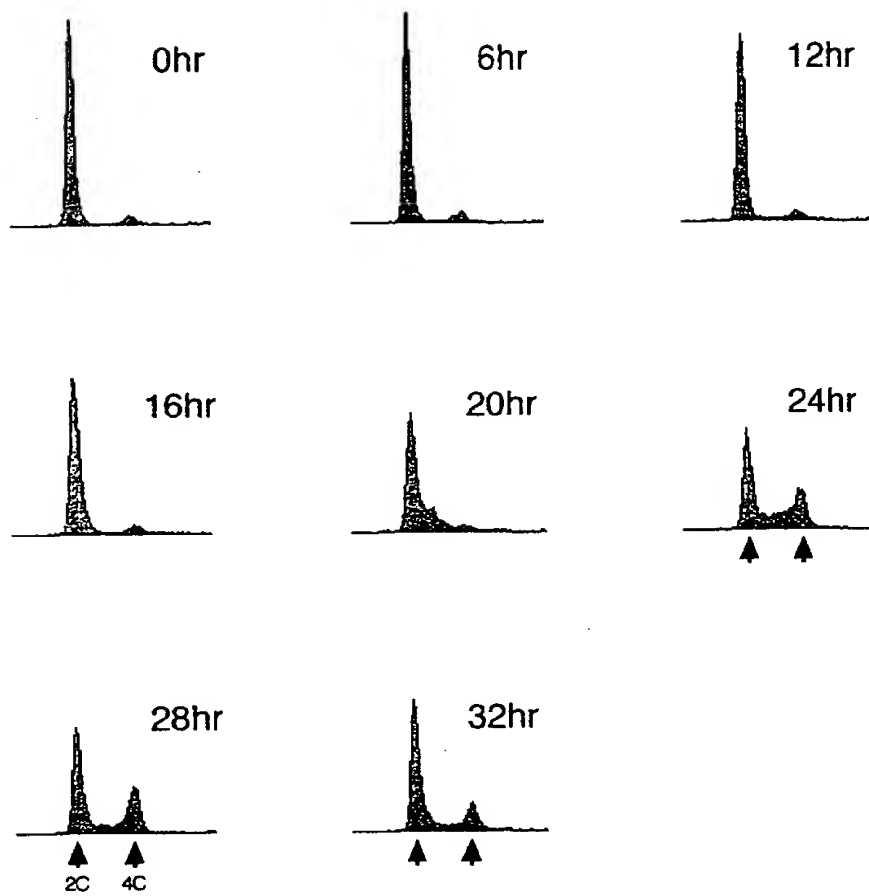
【図9】



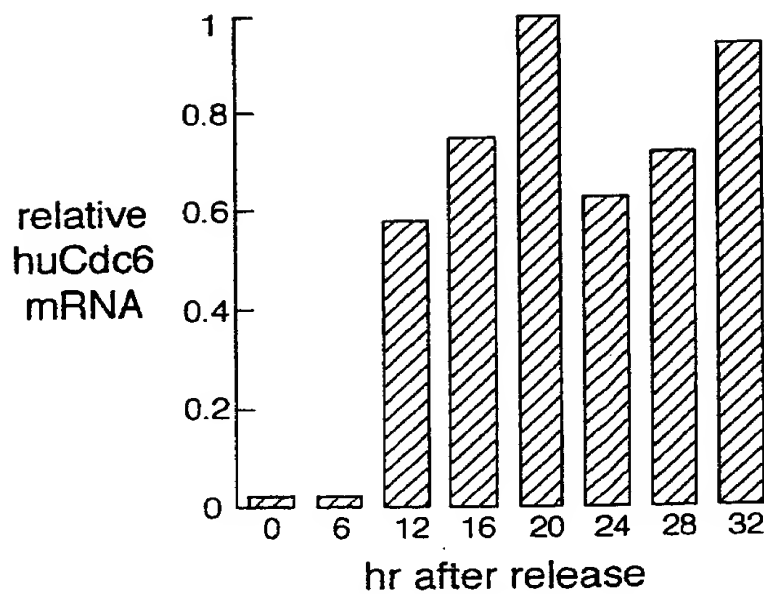
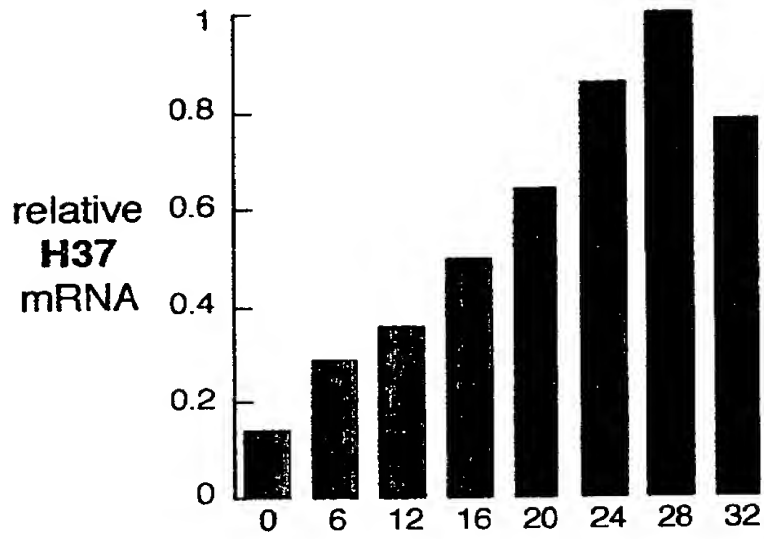
【図 10】



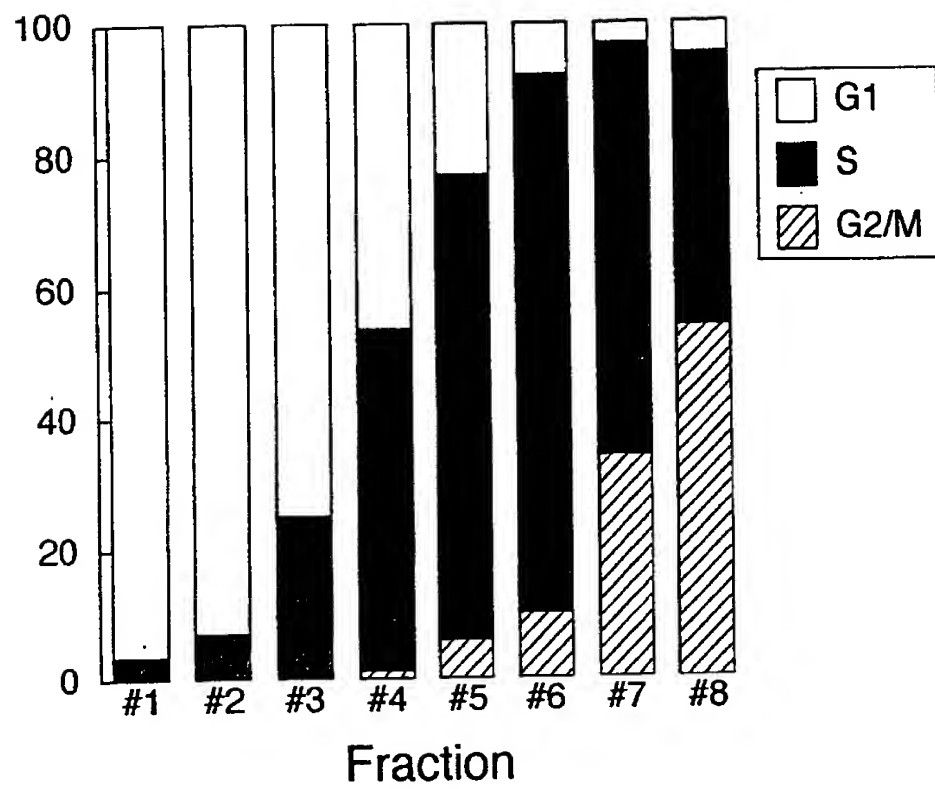
【図 1 1】



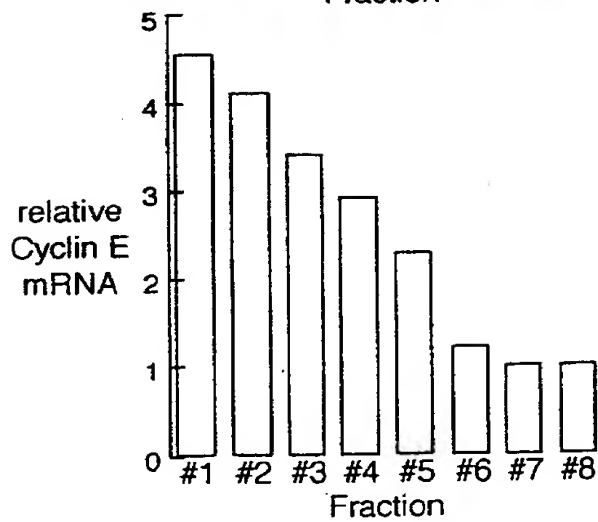
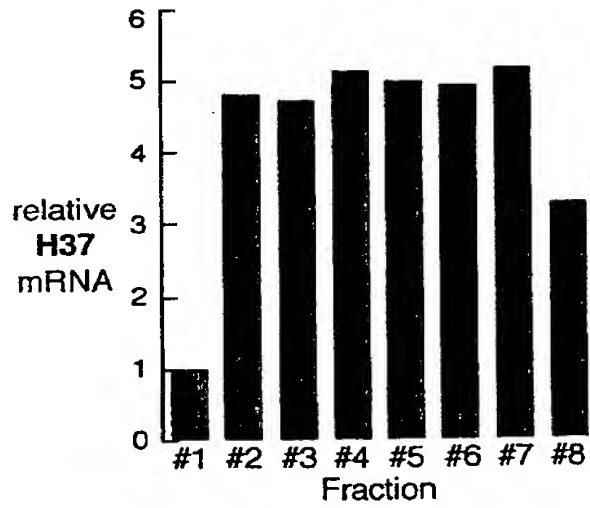
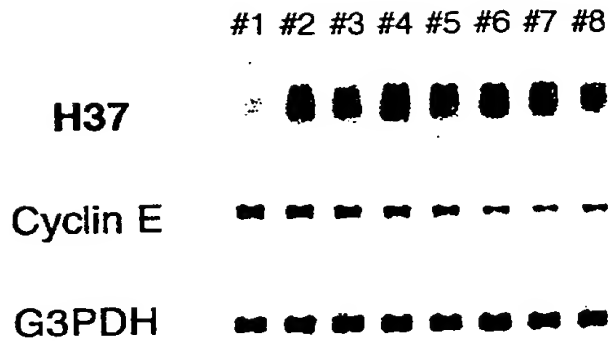
【図 1 2】



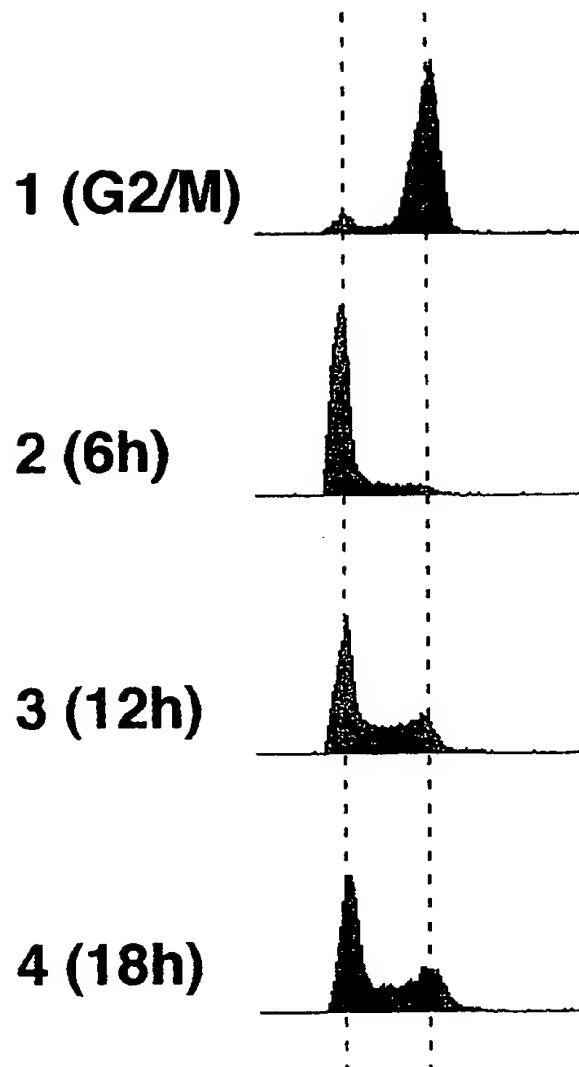
【図13】



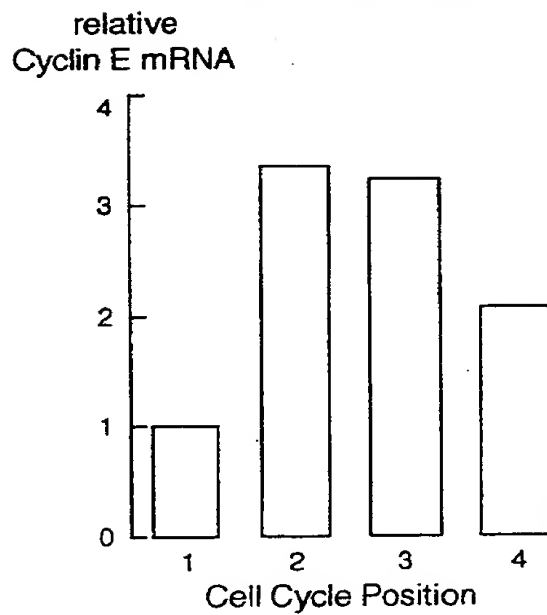
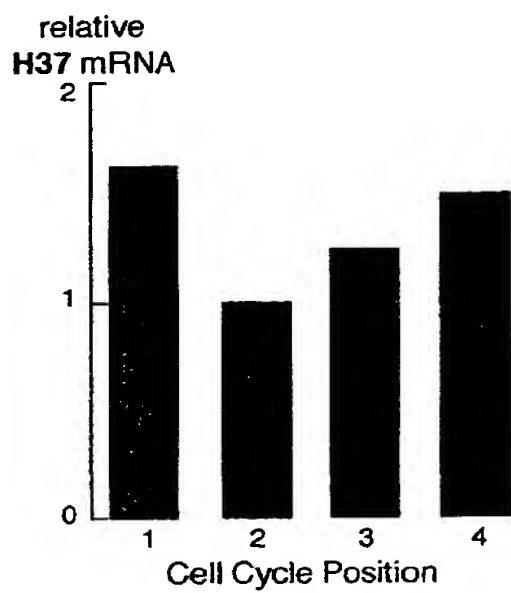
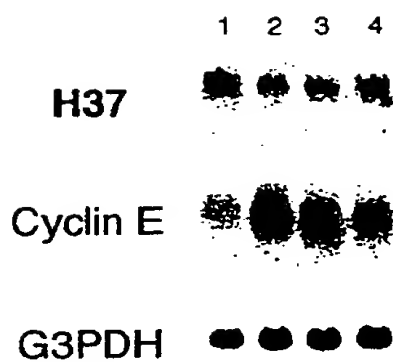
【図 1 4】



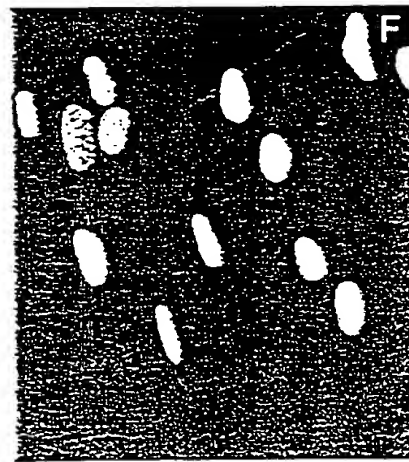
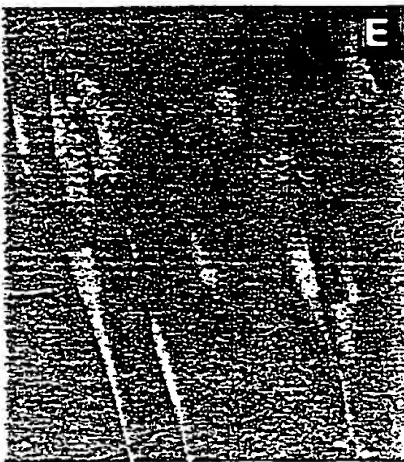
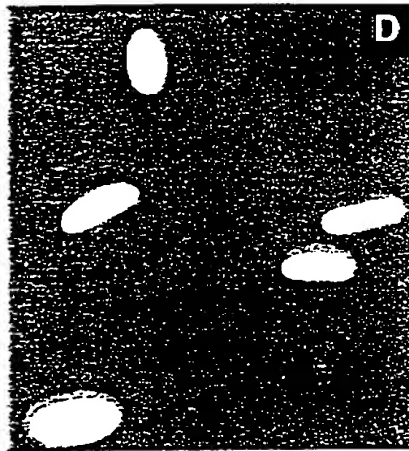
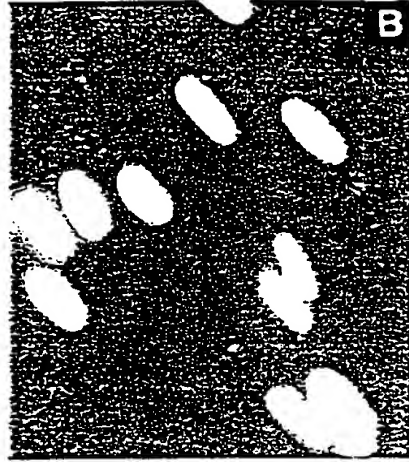
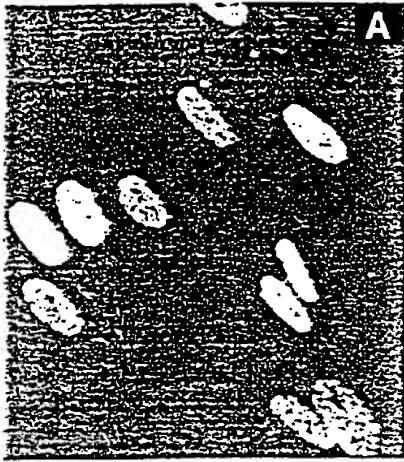
【図 15】



【図 16】

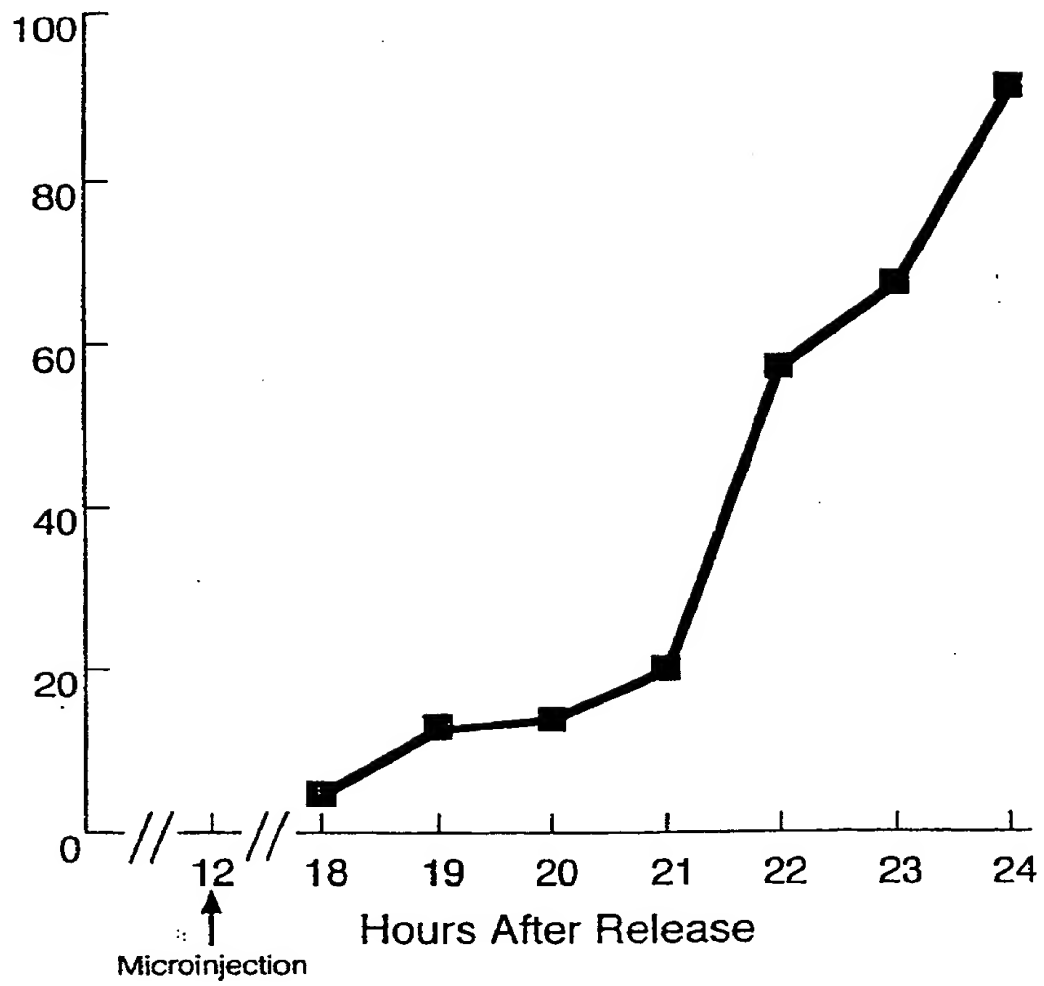


【図 17】

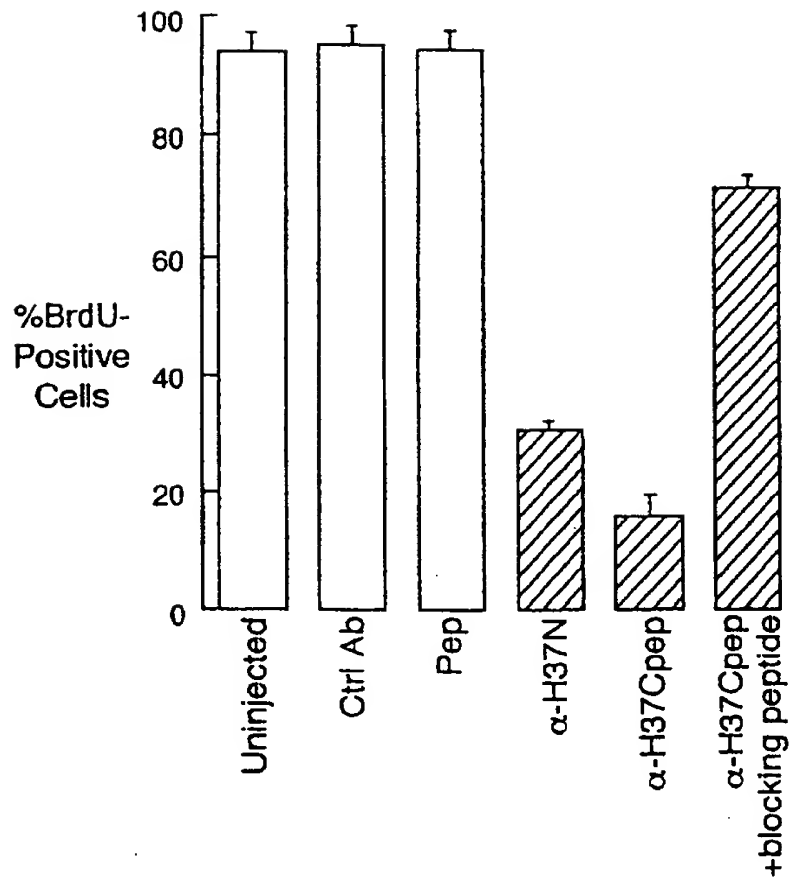


【図 18】

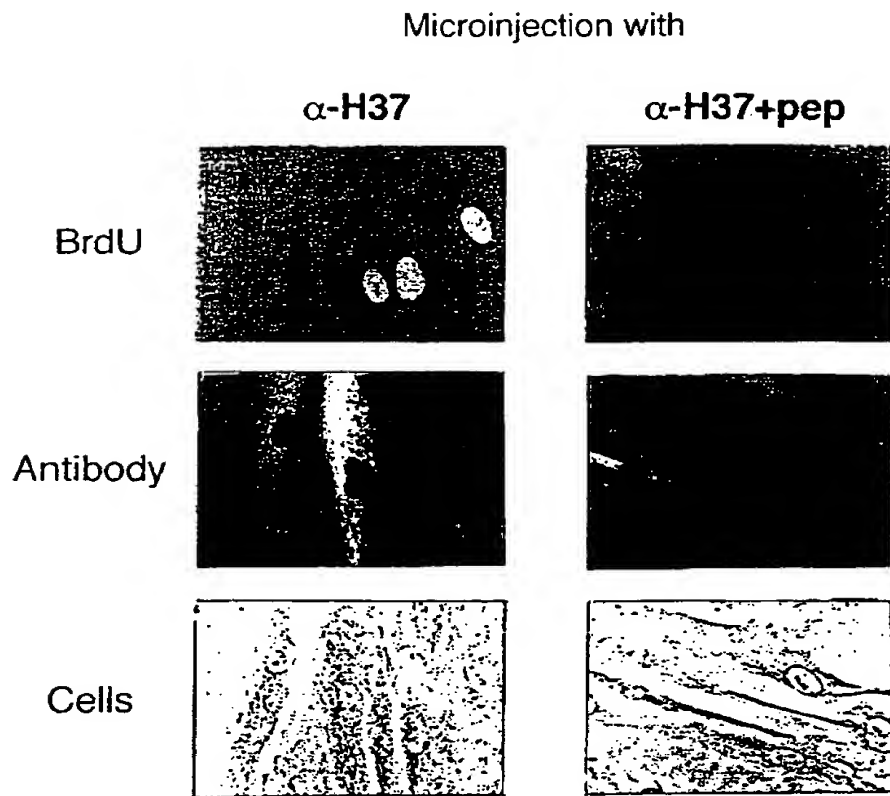
%BrdU-Positive
Cells



【图 19】



【図 20】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法を提供する。

【解決手段】 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質、上記のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、これらcDNAの一部配列からなるDNA断片、上記cDNAを保有する組換えベクター、ヒトH37タンパク質に対する抗体、並びに上記DNAまたは抗体を細胞内に導入することによる細胞増殖制御方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 598150569
【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-6-206
【氏名又は名称】 新井 賢一

【特許出願人】

【識別番号】 598150570
【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シャンボール三田620号
【氏名又は名称】 正井 久雄

【代理人】

申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598150569]

1. 変更年月日 1998年10月30日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都目黒区目黒1-9-6-206
氏 名 新井 賢一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598150570]

1. 変更年月日 1998年10月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区三田5-7-8 シャンボール三田620号

氏 名 正井 久雄